CD138磁珠分选富集试验对多发性骨髓瘤IGH重排遗传学异常及其意义

唐爱林

（桂林医学院附属医院 541001）

**[摘要]**多发性骨髓瘤（MM）是浆细胞克隆性增殖的恶性肿瘤。一种较为常见的浆细胞增殖分化异常的血液系统恶性肿瘤，以骨髓中克隆性浆细胞恶性增殖和异常积累为特征。重要的染色体与基因异常导致疾病的进展，在多发性骨髓瘤中具有独立的预后判断价值。随着遗传学检测技术的进步，已证实14 号染色体免疫球蛋白重链（IgH）重排是MM 结构异常中最常见的改变[1]。IgH重排主要包括11q13（CCND1）、4p16（FGFR3）、16q23（CMAF）、6p21（CCND3）与20q11（MAFB）等不同亚型。本文就通过CD138磁珠分选富集细胞后对亚型IgH重排对MM 的检出率预后作一阐述。

【关键词】多发性骨髓瘤；预后；IgH重排;磁珠分选富集

多发性骨髓瘤（multiple myeloma，MM）是以骨髓中克隆性浆细胞恶性增殖和异常积累为特征的肿瘤[2]。该病发病机制尚不明确，由于单克隆浆细胞恶性增生并广泛浸润，单克隆免疫球蛋白大量出现并沉积，正常多克隆浆细胞和多克隆免疫球蛋白分泌受到抑制，引起广泛骨质破坏、感染、贫血、高钙血症、高粘滞综合征、肾功能不全等临床表现,从而危害病人生命安全[3]。在综合诊断模式中，ＭＭ诊断主要依靠细胞形态学，而细胞遗传学和分子生物学异常是区分危险程度的重要检查指标。随着检测技术的提高，发现几乎所有MM 患者均存在染色体与基因的改变[4]。了解骨髓瘤细胞的遗传学特征是观察MM疗效和判断预后的重要指标[5|。传统的细胞遗传学显带方法(conventional cytogenenties，CC)的异常克隆检出率仅为20％左右[6], 由于多发性骨髓瘤骨髓瘤细胞比例低、体外有丝分裂指数低、中期分裂象少，且多为正常分裂象等因素，常规细胞遗传学方法（ＣＣ）染色体异常检出率只占初诊患者的１／３左右；荧光原位杂交（ＦＩＳＨ）技术将传统的细胞遗传学与ＤＮＡ技术相结合，通过特异性基因探针来识别核型异常，它不依赖中期分裂象的存在，也不受限于常规显带方法的“盲区”，能对已知序列片段的变化进行高度敏感、特异的检测，检测出显带方法不能发现的异常,间期FISH由于不需要培养中期分裂相，明显提高了异常克隆检出率，但是在浆细胞比例低的样本中， FISH的分辨率仍难以发现异常克隆浆细胞。通过磁珠分选富集方，结合传统的FISH技术进行检测，以提高MM的遗传学异常检出率[7-8]。染色体数目异常和染色体结构异常，这些异常是影响MM患者预后的重要因素。14号染色体重排是MM 最常见的结构异常，主要因伙伴染色体与14 号染色体相互易位。fish技术的应用，克服了ＣＣ的缺陷，大大提高了多发性骨髓瘤患者染色体异常的检出率，推进了多发性骨髓瘤的细胞遗传学研究。可通过荧光原位杂交（ＦＩＳＨ）技术检测到的ＩｇＨ易位及其亚型,但由于骨髓瘤病人其浆细胞呈局灶性分布或是骨髓纤维化影响，抽取浆细胞数量少，对于浆细胞比值小于20%的骨髓瘤患者，传统的FISH检测会造成假阴性。应用CD138磁珠分选技术，分选骨髓瘤细胞，更高提高标本阳性检出率。目前能检测到的ＩｇＨ易位检测有t(14;16)、ｔ（11;14）、ｔ（14;16）、ｔ（6;14）及ｔ（１４；２０）。通过磁珠分选试验发现67.6%的MM患者IGH重排阳性[9]。可以检测到染色体14q32的免疫球蛋白重链（IGH)基因位点发生易位，该易位导致癌基因与IGH增强子毗邻，在IGH增强子的影响下表达上调，产生疾病表型，因为增强子被分开到两条衍生染色体上，加之影响范围广泛，导致任一受累染色体上的一个或多个癌基因均可能被上调。其中11q13（CCND1）最常见[10],其次分别为4p16（FGFR3）、16q23（CMAF）。6p21（CCND3）和20q11（MAFB）发生率极低。14 号染色体免疫球蛋白重链（Immunoglobulinheavy chain， IgH） 重排增殖及发展中最重要事件[11-12]。

发现伴t（11；14）的IGH/CCND1基因在MM有较高频的CD20表达，CD56、CD117 表达缺失。IGH/CCND1融合基因导致CCND1蛋白过度表达，可促进细胞增生，是多种人类原发性肿瘤的特征。这种增敏性机制主要是通过活化未折叠蛋白通路和内质网应激信号通路诱导凋亡.t（11；14）易位的患者比正常核型的患者预后差，但比高危患者的疗效好[13]。同时 CCND1 高表达的骨髓瘤细胞对硼替佐米诱导的凋亡具有更高的敏感性。不同研究者关于 t（11；14）对MM 预后方面的结果不同，可能是种族差异、样本量不同、治疗方案各异等原因造成的，鉴于CCND基因异常在MM发病中的重要作用，已经研发出多种 CCND 抑制剂[14]，有望用于 MM 的治疗。另外大剂量化疗和干细胞支持对 t（11； 14）易位的MM 患者疗效相对较好[15-18]。

14q32/4p16，在MM中，FGFR3基因 50～100 kb 处，易位到 14 号染色体IgH调节元件区，引起 FGFR3 高表达，最终激活STA T3，导致瘤细胞恶性增殖。相关实验[19] 发现靶作用于FGFR23 酪氨酸激酶的药物PRO-001，在体外对存FGFR3 高表达引起瘤细胞的恶性增殖，凋亡受抑，而正常浆细胞不能检出 FGFR3 的表达。IGH／FGFR3阳性是高风险标志，高剂量化疗和干细胞治疗后的复发时间很短，需要特异性 FGFR3 抑制。此易位还引起 4 号染色体多发性骨髓瘤 SET 域（multiple myeloma SET domain，MMSET）基因表达明显增强。其与染色质重构、细胞生长及分化的信号调控有关。说明 FGFR3和MMSET 均有潜在致癌作用,而且能够促进MM 向浆细胞白血病方向转化[20-22]。含硼替佐米（硼替佐米＋地塞米松）治疗组在 t（4；14）的 MM 患者中取得较好的疗效。但 t（4；14）的 MM 患者无进展生存期和总生存期仍较低，研究发现 FRFG 与相应的配体结合，其结果可以为MMSET 和 FGFR3 为靶点的治疗策略提供思路及依据，而FGFR 抑制剂可作为在 VEGF 等靶向治疗后产生的克隆演化，是疾病复发患者的有效治疗方案。针对 FGFR3 的单克隆抗体也是靶向治疗的选择之一。

16q23（CMAF）和20q11（MAFB），CMAF、MAFA和MAFB属于大MAF基因组[23],研究发现原癌基因C-MAF在多发性骨髓瘤细胞中高水平表达，其编码的c-Maf蛋白作为转录因子，通过作用于5个下游靶基因CCND2、ITGB7、CCR1、SPP1和ARK5,与细胞周期调控、肿瘤细胞的黏附性、肿瘤侵袭和转移、血管发生等方面有关原癌基因 c-MAF在 50%的 MM 病人骨髓标本中出现异常高表达。c-Maf蛋白诱导细胞增殖是通过促进细胞周期而不是通过抑制细胞凋亡，t（14；16）、t（14； 20）和 t（8；14）易位分别导致 CMAF、MAFB 和MAFA 基因的异常主要包括大 MAF 基因组和小 MAF 基因组。从而在 MM 发生和发展中起重要作用。原癌基因c-maf的高表达与相应IgH易位之间存在相关性，且14q32（IgH）与16q23（c-maf）易位的MM患者预后极差（其中位生存期是24.7个月）。已知仅有4％-10％的MM病例，是由于易位t(14；16)(q32；q23)的发生，使得位于16q23的c-maf耐基因获得了位于14q32的IgH基因3 7端转录增强子，从而导致c-maf出现高表达。近年来研究发现以硼替佐米为代表的蛋白酶体抑制剂和以沙利度胺为代表的免疫调节剂治疗MM 效果明显，但具有 MAF 基因的 MM 患者并未获得较高的缓解率和较长的生存期。近年来，国内外的一些学者研究CMAF 和 MAFB 可被 GSK3 磷酸化，使 CMAF 和 MAFB 基因表达下降，降低骨髓瘤细胞的增殖，这就为 MAF 突变提供了新的治疗策略。

6p21（CCND3）：t（6；14）易位比较少见，发生率不足3%。Mikhael 等 [24] 提出在 2013 年版的梅奥诊所 mSMART 危险分层中 t（6；14）属于预后低危组。针对治疗CCND3的抗CS1（HuLuc630），HuLuc630 在体内可通过自然杀伤细胞介导的抗体依赖细胞毒作用杀伤骨髓瘤细胞，从而抑制骨髓瘤细胞发生发展，从而服务于多发性骨髓瘤患病IGH/CCND3阳性患者，提高生存时间、质量。

IGH重排实验中发现部分染色体不能重排，数目却发生改变，可见扩增或是缺失，此种表现对临术是否有意义，还需进一步的探究。

总结，根据骨髓瘤细胞在机体内分布不均，抽取因难等表现，利用CD138磁珠分选技术，能大大提高检出率。MM遗传学上的特点，染色体复杂，半数以上MM患者可以发生染色体异常，其主要是原发性染色体的异常及治疗过程中的变异克隆。这些改变为临床医生判断MM患者预后提供了重要的遗传学信息。IgH 重排作为 MM 诊断和治疗中的重要参考因素已列入初诊患者的必查项目中 [25] ，分辨 IGH 重排的亚型、染色体的多种表现，进而区分 IGH 重排阳性患者的风险度更具有不可取代的作用。

[1]淑艳，薛永权，黄金文．荧光原位杂交技术在多发性骨髓瘤染色体异常检测中的应用．国外医学输血及血液学分册，2005，28：432435．

[2] Anderson KC， Alsina M， Atanackovic D， et al. Multiple myeloma，

version 2.2016：clinical practice guidelines in oncology ［ J］. J Natl

Compr Canc Netw， 2015， 13 （ 11）： 1398#1435. DOI：

10.6004/jnccn. 2015.0167.

[3] 孙燕, 石远凯. 临床肿瘤内科手册[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013, 67(69): 49-50.

[4]葛峥，李建勇．13号染色体缺失与多发性骨髓瘤[J]．中华血液学chenl J, LiJY， Xu

[5]chenlJ, LiJY，Xu W，etal.Mole cularcy to ge netic a bnormai tiesin patients with multiple my eloma stud iedbyi nter phasefluoresce nceins it uhybridi zatio n ［J ］.E xp Oncol ，2007 ，29（2）：116- 120.

[6] Tricot G，Sawyer J，Jagannath S，el a1．Unique role of cytogenetics

in the prognosis 01‘patients with myeloma receiving high—dose therapy

and autotransplants．J Clin Oncol，1997；15(7)：2659—2666．

[7] Fonseca R，Bergsagel PL，Draeh J，et a1．International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma：spotlight eview．Leukemia，2009；23(12)：2210—2021

[8]中国医师协会血液病分会．中国多发性骨髓瘤诊治指南(2013

年修订)．中华内科杂志，2013；52(9)：791—795．

[9] 高露，刘清，师岩等应用CDl38免疫磁珠分选结合荧光原位杂交技术检测

多发性骨髓瘤细胞遗传学异常 中国实验血液学杂志 2017；25(3)：807—812

[10] 康晓芳 张秀莲 张伟华 IgH 重排与多发性骨髓瘤预后的研究进展 中华临床医师杂志(电子版)2016 年10 月第10 卷第20 期 3090-3094

[11] Kuroda J, Kobayashi T, Taniwaki M. Prognostic indicators oflenalidomide for multiple myeloma: consensus and controversy[J].Expert Rev Anticancer Ther, 2015, 15(7): 787-804.

[12] Yuregir OO, Sahin FI, Yilmaz Z, et al. Fluorescent in situhybridization studies in ultiple myeloma[J]. Hematology, 2009,

14(2): 90-94.

[13] Sasaki K, Lu G, Saliba RM, et al. Impact of t(11; 14)(q13; q32) on the outcome of autologous hematopoietic cell transplantation inmultiple myeloma[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2013, 19(8):1227-1232.

[14] Mao X, Cao B, Wood TE, et al. A small-molecule inhibitor ofD-cyclin transactivation displays preclinical efficacy in myeloma andleukemia via phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. Blood, 2011,117(6): 1986-1997.

[15] Janssen JWG，Vaandrager JW，Heuser T，et al.Concurrent activation of anovel putative transforming gene，myeov，and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14）(q13;q32）[J].Blood，2000，95（8）：2691-269.

[16] Tricot G，Barlogie B，Jagannath S，et al.Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities incolving 11q and not with other karyotype abnomalities[J].Blood，1995，86（11）：4250-4256.

[17] Fonseca R，Blood EA，Oken MM，et al.Myeloma and the t(11;14)(q13;q32);evidence for a biologically defined unique subset of patients[J].Blood，2002，99（10）：3735-3741.

[18] Avet-Loiseau H，Garand R，Lode L，et al.Translocation t(11;14)(q13;q32)is the hallmark of IgM，IgE and nonsecretory multiple myeloma variants[J].Blood，2003，101（4）：1570-1571.

[19] Trudel S，Stewart A K，Rom E，et al.The inhibitory anti-FGFR3 antibody，PRO-001， is cytotoxic to t(4;14)multiple myeloma cells[J].Blood，2006，107（10）：4039-4046.

[20] Xie Z, Chng WJ. MMSET: role and therapeutic opportunities in multiple myeloma[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 636514.

[21] Brito JL, Walker B, Jenner M, et al. MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4; 14) myeloma plasma cells[J]. Haematologica, 2009, 94(1): 78-86.

[22] Marango J, Shimoyama M, Nishio H, et al. The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor[J]. Blood, 2008, 111(6): 3145-3154.

[23] Eychene A, Rocques N, Pouponnot C. A new MAFia in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(9): 683-693.

[24] Mikhael JR, Dingli D, Roy V, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy(mSMART) consensus guidelines 2013[J]. Mayo Clin Proc, 2013, 88(4): 360-376

[25] 中国医师协会血液科医师分会, 中华医学会血液学分会, 中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会. 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2015 年修订)[J]. 中华内科杂志, 2015, 54(12): 1066-1070.